

06.2.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 3 月 3 1 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 9 4 8 8 1
Application Number:

[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 9 4 8 8 1]

出 願 人 昭和電工株式会社
Applicant(s):

REC'D 27 FEB 2004

WIPO

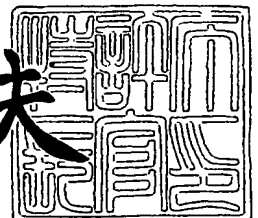
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 月 1 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 SDP4539

【提出日】 平成15年 3月31日

【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿

【国際特許分類】 C12P 1/00

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県千葉市緑区大野台一丁目1番1号 昭和電工株式会社 研究開発センター内

 【氏名】 蒲池 元昭

【発明者】

 【住所又は居所】 北海道札幌市北区新川2条13丁目4-3

 【氏名】 恵良田 知樹

【発明者】

 【住所又は居所】 北海道札幌市西区八軒3条西5丁目2-26-46

 【氏名】 田島 健次

【特許出願人】

 【識別番号】 000002004

 【住所又は居所】 東京都港区芝大門一丁目13番9号

 【氏名又は名称】 昭和電工株式会社

 【代表者】 大橋 光夫

【代理人】

 【識別番号】 100081086

 【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町二丁目2番6号 堀口第2ビル7階 大家特許事務所

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 大家 邦久

 【電話番号】 03(3669)7714

【代理人】

【識別番号】 100117732

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町 2 丁目 2 番 6 号 堀口第 2 ビ
ル 7 階 大家特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 小澤 信彦

【電話番号】 03(3669)7714

【代理人】

【識別番号】 100121050

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町 2 丁目 2 番 6 号 堀口第 2 ビ
ル 7 階 大家特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 林 篤史

【電話番号】 03(3669)7714

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 043731

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0213106

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 酵素反応による高分子化合物の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 チオエステル交換反応と高分子重合酵素反応を共存させた溶液中でチオエステルから高分子化合物を合成する高分子化合物の製造方法。

【請求項 2】 高分子化合物がポリエステルである請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 3】 ポリエステルがポリヒドロキシアルカノエートである請求項 2 に記載の製造方法。

【請求項 4】 ポリヒドロキシアルカノエートがポリ（3-ヒドロキシアルカノエート）である請求項 3 に記載の製造方法。

【請求項 5】 ポリ（3-ヒドロキシアルカノエート）がポリ（3-ヒドロキシブチレート）である請求項 4 に記載の製造方法。

【請求項 6】 チオエステル交換反応がアシルチオエステルからアシルコエンザイム A を生成する反応である請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 7】 アシルチオエステルがチオフェニルエステルである請求項 6 に記載の製造方法。

【請求項 8】 チオフェニルエステルがヒドロキシアルカノエートチオフェニルエステルである請求項 7 に記載の製造方法。

【請求項 9】 ヒドロキシアルカノエートチオフェニルエステルが 3-ヒドロキシアルカノエートチオフェニルエステルである請求項 8 に記載の製造方法。

【請求項 10】 3-ヒドロキシアルカノエートチオフェニルエステルが 3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルである請求項 9 に記載の製造方法。

【請求項 11】 高分子重合酵素反応がアシルコエンザイム A からの高分子重合反応である請求項 1 乃至 10 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 12】 高分子重合酵素がポリヒドロキシアルカノエートシンターゼである請求項 11 に記載の製造方法。

【請求項 13】 ポリヒドロキシアルカノエートシンターゼがラルストニア

(*Ralstonia*) 属由来である請求項 12 に記載の製造方法。

【請求項 14】 ラルストニア (*Ralstonia*) 属がラルストニア・ユートロファ (*Ralstonia eutropha*) である請求項 13 に記載の製造方法。

【請求項 15】 ラルストニア・ユートロファ (*Ralstonia eutropha*) がラルストニア・ユートロファ (*Ralstonia eutropha*) ATCC17699 である請求項 14 に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は酵素反応による高分子化合物の製造方法に関する。さらに詳しく言えば、チオエステル交換反応と高分子重合酵素反応を共存させてアシルコエンザイム (アシル CoA) を反応系内で再生させてチオエステルから高分子化合物を一貫して合成することの出来る効率的な生分解性の高分子化合物、特にポリエステルの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年環境問題への意識の高まりから、従来主流を占めてきた合成高分子から環境に優しい生分解性高分子への関心が高まっている。

【0003】

その一つであるポリヒドロキシアルカノエート (以下、PHA と略記することがある。) は、一般には微生物の発酵生産により製造され、生分解性が高いことから注目を集めているポリエステルであり、90 種以上の種類のものが知られている (FEMS Microbiol. Lett., 1995, 128, 219-228)。その中でもポリ (3-ヒドロキシブチレート) (以下、PHB と略記することがある。)、ポリ (3-ヒドロキシバレレート) (以下、PHV と略記することがある。)、ポリ (3-ヒドロキシブチレート-co-3-ヒドロキシバレレート) (以下、PHB-co-PHV と略記することがある。) は、その製造のしやすさ、及びその特性が良好であったことから研究開発が進んだ (特開昭57-150393号公報、特開昭59-220192号公報、特開昭63-226291号公報、特開昭63-269989号公報)。しかし微生物

の発酵生産では微生物体内に P H A を蓄積するためにその生産性は低く、また微生物を粉碎して P H A を抽出し、精製するためにコストもかかるなど問題点も多かった。

【0004】

その後、発酵生産のメカニズムの解析が進んだことから微生物体内への P H A の蓄積濃度が飛躍的に向上し、また、微生物体内への P H A の蓄積状態の解析が進んだことから微生物からの抽出、精製コストも下がる結果となり、P H A の実用化が始まった。

【0005】

また、P H A を生産する微生物も多種に渡ることが次第に明らかになってきたことから、P H B、P H V、P H B - c o - P H V 以外の P H A への研究開発も急速に進み、物性を改良するためコポリマーの研究開発もされている（特開昭63-269989号公報、特開昭64-48821号公報、特開平1-156320号公報、特開平1-222788号公報、特開平5-93049号公報）。

【0006】

しかし、微生物の発酵生産による P H A の製造方法では複雑な生物代謝経路を経るために必ずしも所望の P H A を作り出せるわけではなく、また P H A のバリエーションも限定される。また発酵生産の制御方法によっては所望のホモポリマーとならずにコポリマーになることもあり、また逆にコポリマー生産においても必ずしも所望の重合比の均質なコポリマーを生産できる訳ではない（FEMS Microbiol. Rev., 1992, 103, 207-214）。さらに精製工程においても多種の化合物を含む微生物菌体より所望の P H A を取り出すために、その純度の向上にも工業的生産においては限界がある。このように微生物発酵による P H A の製造は様々な問題を抱えている。

【0007】

一方、近年急速に進んだ遺伝子組換え技術により、P H A を重合する酵素であるポリヒドロキシアルカノエートシンターゼ（P H A S）の遺伝子が単離され、その発現を増強することにより P H A の生産の向上も図られるようになった（特開平7-265065号公報、特開平10-108682号公報、特表2001-516574号公報）。

【0008】

さらに遺伝子組換え技術を使うことでPHASの大量分離精製もできるようになり、微生物発酵を用いないPHBのインビトロ (in vitro) 重合方法が開発され、均質で高純度なPHBが生産できるようになった (Proc. Natl. Acad. Sci., 1995, 92, 6279-6283、Int. Symp. Bacterial. Polyhydroxyalkanoates, 1996, 28-35、Eur. J. Biochem., 1994, 226, 71-80、Appl. Microbiol. Biotechnol., 1998, 49, 258-266、Macromolecules, 2000, 33, 229-231)。

【0009】

その後、PHB以外のPHAも同様のインビトロ (in vitro) 重合方法で合成できることが示され、微生物発酵法では達成できなかったPHAのバリエーションの制限が無くなり、PHAのバリエーションが格段に広がることが示唆された (Biomacromolecules, 2000, 1, 433-439、Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001, 56, 131-136、Macromolecules, 2001, 34, 6889-6894)。この方法ではホモポリマー以外にコポリマーをも合成することが可能である。

【0010】

しかし、インビトロ (in vitro) 重合方法では反応出発物質に極めて高価である補酵素であるコエンザイムA (CoA) のチオエステルであるアシルCoAを使用しなければならない。またこの合成方法は極めて複雑にならざるを得ない。CoAのチオエステルの製法としては、幾つかの化学合成法が知られている (J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 2520、J. Biol. Chem., 1985, 260, 13181)。しかし、これらの化学合成法は概して反応選択性が低く、副反応のために収率が低い。また酵素反応を用いたCoAのチオエステルの合成方法もある (Appl. Microbiol. Biotechnol., 1994, 40, 699-709) が、これらの酵素反応法ではその触媒である酵素を必要量得ることが非常に困難である。

【0011】

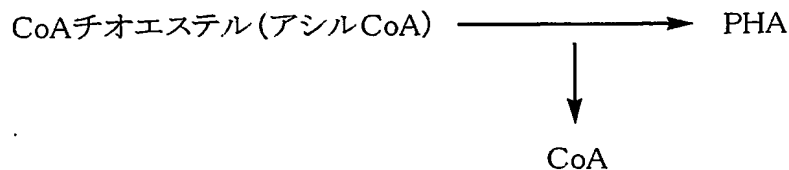
このようにCoAチオエステルを出発物質にした場合には高分子化合物の工業的生産は極めて困難である。そのためCoAチオエステルの使用量を極めて少量に抑えることや、工業的に容易に合成可能な他の化合物を出発物質として用いる高分子化合物の製造方法の開発が望まれている。

【0012】

一方、インビトロ (in vitro) 重合方法では、酵素の基質として CoA チオエステルを用い、酵素が反応して PHA が重合されると共に、反応系内には遊離した CoA が放出される。

【0013】

【化1】



【0014】

従って、インビトロ (in vitro) 重合方法ではこの CoA は遊離状態のまま反応系内に留まり蓄積されるのみであり、高分子重合反応の収率は反応系内に投入した CoA チオエステルの当量を超えることはない。このため PHA の生産性は極めて低く、インビトロ (in vitro) 重合方法で作製した PHA のコストは非常に高価にならざるを得ない。更に重合が進むにつれて反応系内の CoA 濃度が高まることで、酵素反応への阻害効果も懸念される。

【0015】

なお、この遊離して反応系内に高濃度で存在する CoA の有効利用方法としてリサイクリングする試みもなされている (FEMS Microbiology Letters, 1998, 168, 319-324 (非特許文献1))。これは重合酵素反応液中に酢酸とアセチル CoA シンセターゼと ATP を共存させることで重合反応後に遊離してくる CoA をアセチル CoA に変換し、さらにプロピオニル CoA トランスフェラーゼと 3-ヒドロキシブチレートも共存させることで重合酵素の基質となる 3-ヒドロキシブチレート CoA を得るものである。しかしこの方法では精製が困難な酵素を 3 種類も使用し、さらに極めて高価である ATP も必須であることから工業的な生産方法に適用することは極めて難しい。

【0016】

このようにインビトロ重合方法では、その反応基質に補酵素のチオエステルを使わなければならない、補酵素は非常に高価であることから、これを反応基質に用いたまま P H A を工業的に生産するのでは P H A の製造コストを下げるのが極めて困難であると言わざるを得ない。また補酵素をリサイクリングするにも取得が困難な酵素が多種必要であり、かつ、A T P のような高価な化合物が必要である。さらに P H A の生物、特に微生物を用いた製造方法では、P H A のバリエーションは限定され、更に生物体内での代謝により共重合体が重合される可能性が非常に高く、所望の P H A のみを製造するのは難しいと言える。これらのことから P H A のバリエーションが多く、かつ、その生産において簡易に合成できる化合物を出発物質に用いて、P H A の製造コストが下がるような製造方法の開発が望まれていた。

【0017】**【非特許文献1】**

FEMS Microbiology Letters, 1998 年, 168巻, 319-324頁

【0018】**【発明が解決しようとする課題】**

本発明の課題は、酵素反応で有用な生分解性の高分子化合物を製造する際に、触媒量の補酵素 (C o A) で効率的に製造できる方法を提供することにある。

【0019】**【課題を解決するための手段】**

本発明者らは前記従来技術の問題を解決し、さらに高効率な P H A の製造方法を開発すべく、有機化合物から P H A に関連する種々の化合物について新たに合成経路を見出すべく鋭意検討を行った結果、インビトロ重合方法にチオエステル交換反応を組み合わせることで、反応出発物質を容易に合成可能なチオフェニルエステルに代替することが出来、さらに重合反応で必須である補酵素についてもその再生反応を同一反応液系内で行うことが可能であり、補酵素の濃度を抑え、その消費量を劇的に減少させることが出来ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0020】

すなわち、本発明は以下の高分子化合物の製造方法に関する。

1. チオエステル交換反応と高分子重合酵素反応を共存させた溶液中でチオエステルから高分子化合物を合成する高分子化合物の製造方法。
2. 高分子化合物がポリエステルである前項1の製造方法。
3. ポリエステルがポリヒドロキシアлкаノエートである前項2の製造方法。
4. ポリヒドロキシアлкаノエートがポリ（3-ヒドロキシアлкаノエート）である前項3の製造方法。
5. ポリ（3-ヒドロキシアлкаノエート）がポリ（3-ヒドロキシブチレート）である前項4の製造方法。
6. チオエステル交換反応がアシルチオエステルからアシルコエンザイムAを生成する反応である前項1から5の製造方法
7. アシルチオエステルがチオフェニルエステルである前項6の製造方法。
8. チオフェニルエステルがヒドロキシアлкаノエートチオフェニルエステルである前項7の製造方法。
9. ヒドロキシアлкаノエートチオフェニルエステルが3-ヒドロキシアлкаノエートチオフェニルエステルである前項8の製造方法。
10. 3-ヒドロキシアлкаノエートチオフェニルエステルが3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルである前項9の製造方法。
11. 高分子重合酵素反応がアシルコエンザイムAからの高分子重合反応である前項1から10の製造方法。
12. 高分子重合酵素がポリヒドロキシアлкаノエートシンターゼである前項11の製造方法。
13. ポリヒドロキシアлкаノエートシンターゼがラルストニア（*Ralstonia*）属由来である前項12の製造方法。
14. ラルストニア（*Ralstonia*）属がラルストニア・ユートロファ（*Ralstonia eutropha*）である前項13の製造方法。
15. ラルストニア・ユートロファ（*Ralstonia eutropha*）がラルストニア・ユートロファ（*Ralstonia eutropha*） ATCC17699である前項14の製造方法。

【0021】

【発明の実施の形態】

本発明は、チオエステル交換反応と高分子重合酵素反応を共存させた溶液中でチオエステルから高分子化合物を合成する高分子化合物の製造方法に関するものである。

【0022】

本発明において合成される高分子化合物としては、チオエステル交換反応と高分子重合酵素反応を共存させた溶液中でチオエステルから合成される高分子化合物であれば制限はないが、例としては、これまで主に微生物の発酵生産により製造されることが報告されているポリヒドロキシアルカノエート（PHA）を挙げることが出来る。その種類は90種以上が知られている（FEMS Microbiol. Lett., 1995, 128, 219）。更に具体的には、側鎖にC2以上のアルキル鎖を持つもの、その中にはC6以上、更にはC10以上の長鎖アルキル基を有するもの、側鎖に分岐したアルキル基を持つもの、側鎖にフェニル環を持つもの、その中にはフェニル環に修飾基を有するもの、側鎖にフェノキシ環を有するもの、その中にはフェノキシ環に修飾基を有するもの、側鎖に二重結合あるいは三重結合を有するもの、その中には良好な重合性を示すもの、側鎖にハロゲン元素を有するもの、側鎖にシクロ環を有するもの、側鎖にエポキシ環を有するものなどがある。これらのPHAはホモポリマーであることもあれば、2種類以上のユニットからなるコポリマーも含まれる。

【0023】

具体的には、アルキル基については Int. J. Biol. Macromol., 1990, 12, 92-101など、フェニル環については Macromol. Chem., 1990, 191, 1957-1965、Macromolecules, 1991, 24, 5256-5260、Macromolecules, 1996, 29, 1762-1766など、フェノキシ環については Macromolecules, 1996, 29, 3432-3435、Macromol. Chem. Phys., 1994, 195, 1665-1672など、二重結合については Appl. Environ. Microbiol., 1988, 54, 2924-2932、Int. J. Biol. Macromol., 1990, 12, 85-91、J. Polym. Sci., Part A, 1995, 33, 1367-1374、Macromolecules, 1994, 27, 1675-1679、Macromolecules, 1998, 31, 1480-1486など、三重結合については Macromolecules, 1998, 31, 4760-4763など、ハロゲン元素については Mac

romolecules, 1990, 23, 3705-3707、J. Chem. Soc. Polym. Commun., 1990, 31, 404-406、Macromolecules, 1992, 25, 1852-1857、Macromolecules, 1996, 29, 4572-4581などエポキシ環については Macromolecules, 1999, 32, 7389-7395などに示されたPHAも含まれ、炭素数も多様である。

【0024】

高分子化合物の具体例としては、主に生物、特に微生物の発酵生産により製造されることがよく知られているポリ(3-ヒドロキシアリカノエート)やポリ(4-ヒドロキシアリカノエート)を挙げることが出来る。更に、具体的には特にポリ(3-ヒドロキシブチレート)を挙げることができる。

【0025】

本発明に利用できるの高分子重合酵素反応は制限はないが、例としてはアシルコエンザイムAから高分子化合物を生成する反応を挙げることが出来る。特にアシルコエンザイムAとしてはヒドロキシアリカノエートコエンザイムAを用いることが可能であり、その場合は高分子化合物としてPHAが生成する。

【0026】

本発明で使用する高分子重合酵素としては、本発明のチオエステル交換反応で生成する物質を基質として高分子化合物を合成する高分子重合酵素であればよい。例としては、ヒドロキシアリカノエートCoAを基質とし、PHAとする酵素であるポリヒドロキシアリカノエートシンターゼ(PHAS)を挙げることが出来る。高分子重合酵素の取得方法は生物細胞から抽出精製する方法、あるいは生物培養物から抽出精製する方法など多種多様の方法が使われるが、例としてはPHASは微生物細胞から抽出精製することが出来る。しかし通常の抽出精製方法では取得出来る酵素量が極めて少量に限られることから、近年は遺伝子組換え技術を利用してPHASの遺伝子を単離し(J. Biol. Chem., 1989, 264, 15298-15303、J. Bacteriol., 1988, 170, 4431-4436、J. Bacteriol., 1988, 170, 5837-5847)、高発現させることで高分子重合酵素を大量に分離精製できる(J. Biochemistry, 1994, 33, 9311-9320、Protein Expression Purif., 1996, 7, 203-211)。また本発明の高分子重合反応で使用する酵素は、そのまま用いる場合のほかに、固定化酵素などの手法で修飾した酵素を用いることもできる。

【0027】

本発明で用いる高分子重合酵素の由来に生物種としては特に制限はないが、例としてはPHAの生産がよく知られているラルストニア (*Ralstonia*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、クロマチウム (*Chromatium*) 属、エクトチオロスピラ (*Ectothiorhodospira*) 属をはじめ多くの微生物を挙げることが出来る。またこれらの生物由来の高分子重合酵素遺伝子を供与体として有する遺伝子組換え体から高分子重合酵素を取得することも可能である。例としてはラルストニア・ユートロファ (*Ralstonia eutropha*) ATCC17699のPHASの遺伝子を単離し、その組換え体エシェリキア コリ (*Escherichia coli*) を作製して培養し、その培養産物から所望のPHASを抽出精製して、高分子重合反応の触媒として用いることが可能である。

【0028】

本発明の反応条件としては特に制限がないが、例としては酵素反応が促進される条件として、温度としては0℃から60℃、好ましくは10℃から50℃、さらに好ましくは20℃から40℃で行うことが望ましい。簡便には室温下で反応を行うことも可能である。pHは3から12、好ましくは5から10、さらに好ましくは7から9の間で行うことが望ましい。

【0029】

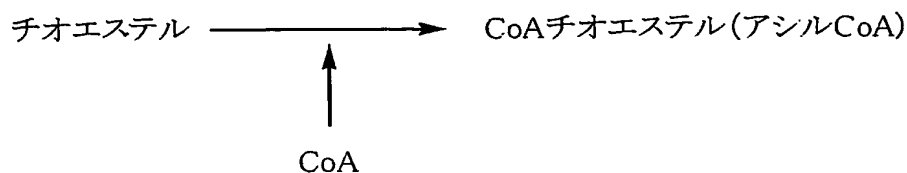
本発明のチオエステル交換反応は、安価な製造しやすいチオエステルから高分子重合酵素の基質となるチオエステルを生成する交換反応であればよいが、例えば、チオエステルとCoAからアシルCoAを生成する反応を挙げることができる。

本発明では、出発物質として工業的に効率的に製造できる化合物であるチオエステルを使用する。チオエステルの製法は例えば、J. Am. Chem. Soc., 1973, 22, 5829に記載されている。

このチオエステルはアルカリ条件でCoA塩と共存させることで容易にCoAのチオエステルであるアシルCoAへと変換するチオエステル交換反応が可能である (Int. Symp. Bacterial. Polyhydroxyalkanoates, 1996, 28-35)。

【0030】

【化2】

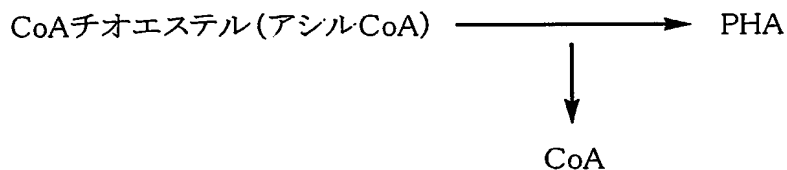


【 0 0 3 1 】

一方、インビトロ重合方法では酵素の基質としてC o Aチオエステルを用い、酵素が反応してP H Aが重合されると共に、反応系内には遊離したC o Aが放出される。

【0 0 3 2】

【化3】



【0 0 3 3】

従って、従来のインビトロ重合方法ではこのC o Aは反応系内に留まり利用されていなかった。またこのために高分子重合反応の収率は反応系内に投入したC o Aチオエステルの当量を超えることはない。そのためにP H Aの生産性は低く、インビトロ重合方法で作製したP H Aのコストは非常に高価にならざるを得ない。更に重合が進むにつれて反応系内のC o A濃度が高まることで酵素反応への阻害効果をもたらすことがあり、その濃度を抑えることはP H Aの生産性を高めるのに非常に有効である。

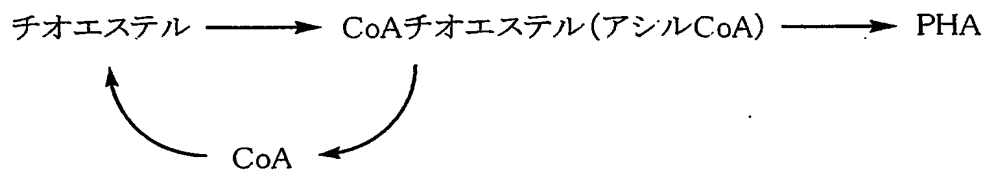
【 0 0 3 4 】

本発明は、この上記 2 つの反応、つまりチオエステル交換反応と高分子重合反応の 2 つの反応を組み合わせて、これらを 1 つの反応系内で共存させて実施することにより高分子化合物を製造するものである。この時の共存する状態とは、チオエステル交換反応と高分子重合反応が同一の水溶液、有機溶媒、あるいはその

混合溶液中に存在すること、あるいは同一反応容器内において一種の溶液、あるいは複数の溶液が混合状態あるいは分離状態で存在している状況である。分離状態は、層状の場合、油滴状に存在、あるいは目視的に懸濁した状態などが含まれる。いずれにおいても、チオエステル交換反応と高分子重合反応に必要な状態が一体化して確保されていればよい。そしてその出発物質としては工業的に効率的に製造可能なチオエステルを用いて、これを反応系内でC o Aのチオエステル化して重合反応の基質とし高分子化合物を製造する。そして重合反応後には反応系内に遊離されてこれまでは再び利用されることのなかったC o Aを、反応系内に投入したチオエステルと反応させて、再びC o Aのチオエステルを合成せしめ、これを重合反応の基質として再び用いるものである。

【0035】

【化4】



【0036】

これにより反応系内に投入したC o Aの当量以上の高分子化合物を生成物として得ることができるようになる。特にこのC o Aがチオエステル化と遊離を繰り返すことの反応回転数が多くなればなるほど、高分子化合物の工業的なコストを飛躍的に低価格化させることが可能となる。

【0037】

このように本発明は、高効率にP H Aを製造する方法であり、反応出発物質は容易に合成可能なチオエステルを用い、さらにチオエステル交換反応と高分子重合反応が共存した溶液中でチオエステルから高分子化合物を合成する高分子化合物の製造方法に関わるものである。

【0038】

【実施例】

以下に参考例、実施例及び比較例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、本

発明はこれら実施例によって何ら限定されるものではない。

【0039】

参考例 1 (1) : 3-オキソブチレートエチルエステルの合成

氷上で、乾燥したフラスコ中で 3.9 g のメルドラム酸を 18 ml の脱水ジクロロメタンに溶かして攪拌したところへ、18 ml の脱水ジクロロメタンに溶解した 4.3 g のピリジンと 2.2 g のアセチルククロライドの溶液を窒素気流下でゆっくりと添加した。攪拌は 0℃ で 1 時間の後、室温で 2 時間行った。混合液を分液漏斗に移し、3% 塩酸溶液で 2 回、飽和食塩水で 2 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧下でエバポレーションして、ゆっくりと固化する濃オレンジ色でオイル状の 3.6 g の粗アシル化メルドラム酸を得た。この粗アシル化メルドラム酸を 80 ml の脱水エタノール中で還流した。この時二酸化炭素の発生が観察された。溶媒をエバポレーションで取り除き、赤色オイル状の 1.3 g の粗 3-オキソブチレートエチルエステルを得た。これをシリカゲル 60 のカラムクロマトグラフィー (20 cm × Φ 1 cm、溶離液はヘキサン：酢酸エチル = 2 : 1) で精製し、少し黄色でオイル状の 0.60 g の精製 3-オキソブチレートエチルエステルを得た。収率は未精製品に対して 46% であった。この化合物の NMR 分析結果を以下に示す。

^1H NMR (in CDCl_3) δ 4.20 (q, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 3.47 (s, 2H), 2.27 (s, 3H), 1.28 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H);

^{13}C NMR (in CDCl_3) δ 201.06, 167.44, 61.52, 50.29, 30.32, 14.29

【0040】

参考例 1 (2) : 3-ヒドロキシブチレートエチルエステルの合成

乾燥したフラスコ中で 75.6 mg の水素化ホウ素ナトリウムを 2 ml の脱水エタノールに溶かした溶液を攪拌し、そこへ 520 mg の 3-オキソブチレートエチルエステルを 2 ml の脱水エタノールに溶解した溶液をゆっくりと添加した。攪拌は室温で 2 時間行い、その後 4 ml の水を添加した。混合溶液を分液漏斗へ移し、ジクロロメタンで 2 回抽出した後、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下でエバポレーションして、薄い黄色のオイル状の 282 mg の 3-ヒドロキシブチレートを得た。この化合物の NMR 分析結果を以下に示す。

^1H NMR (in CDCl_3) δ 4.17(q, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 4.17(m, 1H), 2.46(m, 2H), 1.28(t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H), 1.23(d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H);

^{13}C NMR (in CDCl_3) δ 172.93, 64.28, 60.68, 42.91, 22.49, 14.18

【0041】

参考例 1 (3) : 3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルの合成

氷上で乾燥したフラスコ中で 6 ml の脱水ジクロロメタンを攪拌し、そこへ 2 ml の 2 M トリメチルアルミニウムを窒素気流下でゆっくりと添加した。そこへ続けて 2 mmol のチオフェノールをゆっくりと添加した。室温で 30 分間攪拌し、続けて 6 ml の脱水ジクロロメタンに溶解した 3-ヒドロキシブチレートを添加した。反応は TLC でモニターした。この混合液に 20 ml のジクロロメタンを加え、気泡発生が止むまで 20 ml の 3% 塩酸溶液を添加した。混合液を分液漏斗へ移し、3% 塩酸溶液で 2 回、飽和食塩水で 2 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、減圧下でエバポレーションして濃黄色のオイル状の 532 mg の粗 3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルを得た。これをシリカゲル 60 のカラムクロマトグラフィー (20 cm \times Φ 1 cm、溶離液はヘキサン: 酢酸エチル = 2 : 1) で精製し、透明なオイル状の 125 mg の 3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルを得た。収率は未精製品に対して 24% であった。その化合物の NMR 分析結果を以下に示す。

^1H NMR (in CDCl_3) δ 7.38(s, 5H), 4.33(m, 1H), 2.83(m, 2H), 1.25(d, 3H);

^{13}C NMR (in CDCl_3) δ 198.24, 134.90, 130.07, 129.69, 127.61, 65.23, 52.02, 22.85

【0042】

参考例 1 (4) : 3-ヒドロキシブチレート CoA チオエステルの合成

小さなガラス瓶に 39.5 mg のコエンザイム A ナトリウム塩を 0.5 ml の 100 mM リン酸カルシウム緩衝液 (pH 8.0) に攪拌して溶かした溶液に、9.8 mg の 3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルを 0.1 ml のアセトニトリルに溶かした溶液を添加した。攪拌は室温で 3 時間続け、次に 0.13 ml の 1 M リン酸を添加した。混合液を 0.5 ml のジエチルエーテルで 3 回洗浄し、減圧下でエバポレーションして 30 mM の 3-ヒドロキシブチレート CoA チオエステル溶液

を得た。

【0043】

参考例 2 (1) : (R) - 3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルの合成

2.53 g の t-ブチルジメチルシリルクロライドを無水ジメチルホルムアミドに溶かして攪拌したところへ、3.4 g のイミダゾールを添加し、氷上、窒素気流下で 15 分攪拌した。更に無水ジメチルホルムアミドに溶解した 0.5 g の (R) - 3-ヒドロキシブチレートを添加して室温で一晩攪拌した。反応液に 60 ml の飽和食塩水を加え、ジエチルエーテル：石油エーテル = 1 : 3 溶液での抽出を 5 回繰り返した。抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧下でエバポレーションした。これをメタノール：テトラヒドロフラン = 2 : 1 溶液に溶解し、1.5 g の炭酸カリウムを含む 10 ml の水溶液を加え、室温で一晩攪拌した。反応液は飽和食塩水で希釈し、更に 1 M 硫酸で pH を 3.0 に調整し、ジエチルエーテル：石油エーテル = 1 : 3 溶液での抽出を 5 回繰り返した。抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧下でエバポレーション後、真空乾燥して 3- (t-ブチルジメチルシリル) ブチレートを得た。氷上で、870 mg の 3- (t-ブチルジメチルシリル) ブチレートと 452 mg のチオフェノールを 6 ml のジクロロメタンに溶解し、これに 2 ml のジクロロメタンに溶解した 846 mg のジシクロヘキシルカルボジイミドを添加し攪拌後、室温で 10 時間攪拌した。20 ml のジエチルエーテルを加えてろ過後、溶媒をエバポレーションで取り除き、フラッシュクロマトグラフィー (溶離液は 5 % 酢酸エチルを含むヘキサン) で 330 mg の 3- (t-ブチルジメチルシリル) ブチレートチオフェニルエステルを得た。これを 2 ml アセトニトリルに溶解し、更に 6 ml の 5 % フッ化水素を含むアセトニトリル溶液を加えた。20 分の反応後、気泡が発生しなくなるまで飽和炭酸水素ナトリウム溶液を添加し、ジエチルエーテルで抽出後、飽和食塩水で洗浄、硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧下でエバポレーションして 81 mg の (R) - 3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルを得た。

【0044】

参考例 2 (2) : (R) - 3-ヒドロキシブチレート CoA チオエステルの合成

3-ヒドロキシブチレート CoAチオエステルの合成と同様にして、3-ヒドロキシブチレート CoAチオエステル溶液を得た。

【0045】

参考例 3 (1) : 3-オキソバレレートエチルエステルの合成

氷上で、乾燥したフラスコ中で3.9 gのメルドラム酸を18 mlの脱水ジクロロメタンに溶かして攪拌したところへ、18 mlの脱水ジクロロメタンに溶解した4.3 gのピリジンと2.5 gのプロピオニルクロライドの溶液を窒素気流下でゆっくりと添加した。攪拌は0℃で1時間の後、室温で2時間行った。混合液を分液漏斗に移し、3%塩酸溶液で2回、飽和食塩水で2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧下でエバポレーションして、ゆっくりと固化する濃オレンジ色でオイル状の3.4 gの粗アシル化メルドラム酸を得た。この粗アシル化メルドラム酸を80 mlの脱水エタノール中で還流した。この時二酸化炭素の発生が観察された。溶媒をエバポレーションで取り除き、赤色オイル状の1.7 gの粗3-オキソバレレートエチルエステルを得た。これをシリカゲル60のカラムクロマトグラフィー(20 cm×Φ1 cm、溶離液はヘキサン:酢酸エチル=2:1)で精製し、少し黄色でオイル状の0.50 gの精製3-オキソバレレートエチルエステルを得た。収率は未精製品に対して29%であった。この化合物のNMR分析結果を以下に示す。

^1H NMR (in CDCl_3) δ 4.19(q, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 3.40(s, 2H), 2.58(q, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 1.28(t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H), 1.08(t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H);

^{13}C NMR (in CDCl_3) δ 203.48, 180.07, 61.33, 49.03, 36.32, 14.13, 7.56

【0046】

参考例 3 (2) : 3-ヒドロキシバレレートエチルエステルの合成

乾燥したフラスコ中で75.6 mgの水素化ホウ素ナトリウムを1 mlの脱水エタノールに溶かした溶液を攪拌し、そこへ288 mgの3-オキソバレレートエチルエステルを1 mlの脱水エタノールに溶解した溶液をゆっくりと添加した。攪拌は室温で2時間行い、その後2 mlの水を添加した。混合溶液を分液漏斗へ移し、ジクロロメタンで2回抽出した後、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下でエバポレーションして、薄い黄色のオイル状の212 mgの3-ヒドロキシバレレ

ートを得た。この化合物のNMR分析結果を以下に示す。

^1H NMR (in CDCl_3) δ 4.17(q, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 3.94(m, 1H), 2.45(m, 2H), 1.57(m, 2H), 1.27(t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H), 0.96(t, $J=7.3\text{Hz}$, 3H);

^{13}C NMR (in CDCl_3) δ 173.30, 69.64, 60.91, 41.46, 29.77, 14.40, 10.07

【0047】

参考例3 (3) : 3-ヒドロキシバレレートチオフェニルエステルの合成

氷上で乾燥したフラスコ中で3mlの脱水ジクロロメタンを攪拌し、そこへ1mlの2Mトリメチルアルミニウムを窒素気流下でゆっくりと添加した。そこへ続けて1mmolのチオフェノールをゆっくりと添加した。室温で30分間攪拌し、続けて3mlの脱水ジクロロメタンに溶解した3-ヒドロキシバレレートを添加した。反応はTLCでモニターした。この混合液に10mlのジクロロメタンを加え、気泡発生が止むまで10mlの3%塩酸溶液を添加した。混合液を分液漏斗へ移し、3%塩酸溶液で2回、飽和食塩水で2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、減圧下でエバポレーションして濃黄色のオイル状の258mgの粗3-ヒドロキシバレレートチオフェニルエステルを得た。これをシリカゲル60のカラムクロマトグラフィー(20cm \times Φ 1cm、溶離液はヘキサン:酢酸エチル=2:1)で精製し、透明なオイル状の44mgの3-ヒドロキシバレレートチオフェニルエステルを得た。収率は未精製品に対して17%であった。その化合物のNMR分析結果を以下に示す。

^1H NMR (in CDCl_3) δ 7.39(s, 5H), 4.04(m, 1H), 2.82(m, 2H), 1.60(m, 2H), 0.98(t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H);

^{13}C NMR (in CDCl_3) δ 198.30, 134.67, 129.83, 129.46, 127.31, 70.04, 50.03, 29.67, 9.96

【0048】

参考例3 (4) : 3-ヒドロキシバレレートCoAチオエステルの合成

小さなガラス瓶に79mgのコエンザイムAナトリウム塩を2mlの100mMリン酸カリウム緩衝液(pH8.0)に攪拌して溶かした溶液に、42mgの3-ヒドロキシバレレートチオフェニルエステルを1mlのアセトニトリルに溶かした溶液を添加した。攪拌は室温で3時間続け、次に0.53mlの1Mリン酸を添

加した。混合液を2mlのジエチルエーテルで3回洗浄し、減圧下でエバポレーションして33mMの3-ヒドロキシブチレートCoAチオエステル溶液を得た。

【0049】

参考例4：酵素の作製と精製

ラルストニア・ユートロファ (*Ralstonia eutropha*) ATCC17699のゲノムDNAから制限酵素EcoRIとSmaI断片(約5kbp)を切り出し、pUC18にクローニングしてPHA合成酵素遺伝子(PHAS)を含むプラスミドpTI305を取得した。次にpTI305のNotI・StuI断片(1.6kbp)と、pTI305をテンプレートとして下記2種のプライマーでPCRにより増幅したDNAのBamHI・NotI断片(140bp)と、ベクターpQE30(キアゲン社製)のBamHIとSmaI断片の3種類を混合してライゲーションし、プラスミドpQERECを調整した。これを大腸菌BL21(pREP4)に導入して、酵素調製用の大腸菌BL21(pQEREC)を作製した。この大腸菌を1000mlのLB培地中、30℃で16時間培養し、菌体内に酵素を蓄積させ、超音波処理によって菌体を破壊した後、菌体内の可溶性タンパク質を回収した。このタンパク質をNi-NTAアガロースゲルカラムに通し、(His)-PhaC(N末にヒスチジンが6個付加されている)を特異的にカラムに吸着させた。洗浄後、イミダゾールを用いて(His)-PhaCを溶出し、透析後に精製酵素として10mgを得た。酵素の分子量はSDS-PAGEで65kDaであった。

【0050】

PCRの条件

センスプライマー：AAGGATCCATGGCGACCGGCAAAGGCGCGG(配列番号1)、

アンチセンスプライマー：TGCAGCGGACCGGTGGCCTCGGCC TGCCC(配列番号2)、

サイクル：(94℃45秒、58℃30秒、72℃60秒)×30サイクル。

【0051】

実施例 1: ポリ ((R)-3-ヒドロキシブチレート) の重合

5 ml の 100 mM リン酸カリウム溶液に 0.015 mg の酵素を添加して室温でよく攪拌した。攪拌速度を軽く混ざる程度に落として溶液温度を 30℃ に保ち、ここに 5 ml の 1 mM CoA ナトリウム溶液と、0.5 ml の 20 mM 3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステル溶液 (100 mM リン酸カリウム溶液とアセトニトリルの 1:1 溶液に溶解) を少しずつ添加し、さらに 30℃ で 24 時間反応させた。次にこの溶液を 20 ml のヘキサンで 3 回洗浄し、更に 10 ml のクロロホルムで溶液中の生成物を抽出、回収した。これを 3 回繰り返した。抽出液はフィルターを過した後、300 ml のメタノール中に滴下して 24 時間放置した。生成した沈殿物をフィルターを過して回収し、真空乾燥機で乾燥し、0.4 mg のポリ ((R)-3-ヒドロキシブチレート) を得た。分子量 (ポリスチレン換算の GPC) は $M_w = 970000$ であった。その化合物の NMR 分析結果を以下に示す。

^1H NMR (in CDCl_3) δ 5.26 (m, H), 2.53 (m, 2H), 1.25 (s, 3H);

^{13}C NMR (in CDCl_3) δ 169.53, 67.99, 41.16, 20.15

【0052】

比較例 1: ポリ ((R)-3-ヒドロキシブチレート) の重合

5 ml の 100 mM リン酸カリウム溶液に 0.015 mg の酵素を添加して室温でよく攪拌した。攪拌速度を軽く混ざる程度に落として溶液温度を 30℃ に保ち、ここに 5 ml の 1 mM CoA ナトリウム溶液を少しずつ添加し、さらに 30℃ で 24 時間反応させた。次にこの溶液を 20 ml のヘキサンで 3 回洗浄し、更に 10 ml のクロロホルムで溶液中の生成物を抽出、回収した。これを 3 回繰り返した。抽出液はフィルターを過した後、300 ml のメタノール中に滴下して 24 時間放置した。しかし沈殿物は得られなかった。

【0053】

実施例 2: ((R)-3-ヒドロキシブチレート) の重合

5 ml の 100 mM リン酸カリウム溶液に 0.015 mg の酵素を添加して室温でよく攪拌した。攪拌速度を軽く混ざる程度に落として溶液温度を 30℃ に保ち、ここに 5 ml の 1 mM 3-ヒドロキシブチレート CoA 溶液と、0.5 ml の 20

mM3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステル溶液 (100mMリン酸カリウム溶液とアセトニトリルの1:1溶液に溶解) を少しずつ添加し、さらに30℃で24時間反応させた。次にこの溶液を20mlのヘキサンで3回洗浄し、更に10mlのクロロホルムで溶液中の生成物を抽出、回収した。これを3回繰り返した。抽出液はフィルターろ過した後、300mlのメタノール中に滴下して24時間放置した。生成した沈殿物をフィルターろ過して回収し、真空乾燥機で乾燥し、0.3mgのポリ ((R)-3-ヒドロキシブチレート) を得た。

【0054】

比較例2: ポリ ((R)-3-ヒドロキシブチレート) の重合

5mlの100mMリン酸カリウム溶液に0.015mgの酵素を添加して室温でよく攪拌した。攪拌速度を軽く混ざる程度に落として溶液温度を30℃に保ち、5mlの1mM3-ヒドロキシブチレートCoAを少しずつ添加し、さらに30℃で24時間反応させた。次にこの溶液を20mlのヘキサンで3回洗浄し、更に10mlのクロロホルムで溶液中の生成物を抽出、回収した。これを3回繰り返した。抽出液はフィルターろ過した後、300mlのメタノール中に滴下して24時間放置した。生成した沈殿物をフィルターろ過して回収し、真空乾燥機で乾燥し、0.2mgのポリ ((R)-3-ヒドロキシブチレート) を得た。

【0055】

比較例3:

5mlの100mMリン酸カリウム溶液に0.015mgの酵素を添加して室温でよく攪拌した。攪拌速度を軽く混ざる程度に落として溶液温度を30℃に保ち、ここに0.5mlの20mM3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステル溶液 (100mMリン酸カリウム溶液とアセトニトリルの1:1溶液に溶解) を少しずつ添加し、さらに30℃で24時間反応させた。次にこの溶液を20mlのヘキサンで3回洗浄し、更に10mlのクロロホルムで溶液中の生成物を抽出、回収した。これを3回繰り返した。抽出液はフィルターろ過した後、300mlのメタノール中に滴下して24時間放置した。しかし沈殿物は得られなかった。

【0056】

実施例3: ポリ (3-ヒドロキシバレレート) の重合

5 ml の 100 mM リン酸カリウム溶液に 0.015 mg の酵素を添加して室温でよく攪拌した。攪拌速度を軽く混ざる程度に落として、ここに 5 ml の 1 mM (R, S) - 3 - ヒドロキシバレレート CoA と、0.5 ml の 20 mM 3 - ヒドロキシバレレートチオフェニルエステル溶液 (100 mM リン酸カリウム溶液とアセトニトリルの 1 : 1 溶液に溶解) を少しずつ添加し、さらに室温で 24 時間反応させた。次にこの溶液を 20 ml のヘキサンで 3 回洗浄し、更に 10 ml のクロロホルムで溶液中の生成物を抽出、回収した。これを 3 回繰り返した。抽出液はフィルターろ過した後、300 ml のメタノール中に滴下して 24 時間放置した。生成した沈殿物をフィルターろ過して回収し、真空乾燥機で乾燥し、0.3 mg のポリ ((R) - 3 - ヒドロキシバレレート) を得た。その化合物の NMR 分析結果を以下に示す。

^1H NMR (in CDCl_3) δ 5.12(m, H), 2.56(m, 2H), 1.53(m, 2H), 0.81(t, 3H);

^{13}C NMR (in CDCl_3) δ 169.71, 72.26, 39.17, 27.23, 9.76

【0057】

比較例 4 : ポリ (3 - ヒドロキシバレレート) の重合

5 ml の 100 mM リン酸カリウム溶液に 0.015 mg の酵素を添加して室温でよく攪拌した。攪拌速度を軽く混ざる程度に落として 5 ml の 1 mM (R, S) - 3 - ヒドロキシバレレート CoA を少しずつ添加し、さらに室温で 24 時間反応させた。次にこの溶液を 20 ml のヘキサンで 3 回洗浄し、更に 10 ml のクロロホルムで溶液中の生成物を抽出、回収した。これを 3 回繰り返した。抽出液はフィルターろ過した後、300 ml のメタノール中に滴下して 24 時間放置した。生成した沈殿物をフィルターろ過して回収し、真空乾燥機で乾燥し、0.1 mg のポリ ((R) - 3 - ヒドロキシバレレート) を得た。

【0058】

実施例 4 : (R) - 3 - ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルからポリ ((R) - 3 - ヒドロキシブチレート) の重合

5 ml の 100 mM リン酸ナトリウム溶液 (pH 7.5)、1 mM CoA ナトリウム塩溶液に 0.015 mg の酵素を添加して溶液温度を 30 °C に保ち攪拌した。その上に 10 mM (R) - 3 - ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルを 5 ml

1のヘキサン溶液を重層した。攪拌速度を軽く混ざる程度に落として、30℃で24時間反応させた。反応後にヘキサン層を除去し、次に水層中から5mlのクロロホルムで溶液中の生成物を抽出した。これを2回繰り返した。抽出溶液をフィルターろ過した後、200mlのメタノール中に滴下して4℃で24時間放置した。生成した沈殿物をフィルターろ過して回収し、真空乾燥機で乾燥し、1.5mgのポリ((R)-3-ヒドロキシブチレート)を得た。分子量(ポリスチレン換算のGPC)は $M_w=1070000$ であった。また、添加したCoAのチオエステル化と遊離の反応回転数は3.4回である。

【0059】

比較例5: (R)-3-ヒドロキシブチレートCoAチオエステルからポリ((R)-3-ヒドロキシブチレート)の重合

5mlの100mMリン酸ナトリウム溶液(pH7.5)、1mM(R)-3-ヒドロキシブチレートCoAチオエステル溶液に0.015mgの酵素を添加して溶液温度を30℃に保ち攪拌した。攪拌速度を軽く混ざる程度に落として、30℃で24時間反応させた。反応後にヘキサン層を除去し、次に水層中から5mlのクロロホルムで溶液中の生成物を抽出した。これを2回繰り返した。抽出溶液をフィルターろ過した後、200mlのメタノール中に滴下して4℃で24時間放置した。生成した沈殿物をフィルターろ過して回収し、真空乾燥機で乾燥し、0.4mgのポリ((R)-3-ヒドロキシブチレート)を得た。

【0060】

比較例6 (R)-3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルからポリ((R)-3-ヒドロキシブチレート)の重合

5mlの100mMリン酸ナトリウム溶液(pH7.5)に0.015mgの酵素を添加して溶液温度を30℃に保ち攪拌した。その上に10mM(R)-3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルを5mlのヘキサン溶液を重層した。攪拌速度を軽く混ざる程度に落として、30℃で24時間反応させた。反応後にヘキサン層を除去し、次に水層中から5mlのクロロホルムで溶液中の生成物を抽出した。これを2回繰り返した。抽出溶液をフィルターろ過した後、200mlのメタノール中に滴下して4℃で24時間放置した。沈殿物は観察されなかった。

【0061】

【発明の効果】

本発明は、PHAの製造方法において、インビトロ (in vitro) 重合方法にチオエステル交換反応を組み合わせることで、反応出発物質を容易に合成可能なチオフェニルエステルに代替し、さらに重合反応で必須である補酵素についてもその再生反応を同一反応液系内で行うことが可能たらしめ、補酵素の消費量を劇的に減少されることを出来るようにすることで、工業的な生産方法への利用を可能とする新規なPHA製造方法を提供する。この発明により、様々なPHAが安価に効率よく製造できるようになり、その使用範囲も飛躍的に広がるものである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SHOWA DENKO K.K.

<120> Method for Producing Polymer by Enzymatic Reaction

<130> SDP-4539

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sense primer

<400> 1

aaggatccat ggcgaccggc aaaggcgcgg

30

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense primer

<400> 2

tgcagcggac cggtaggcctc ggcctgccc

29

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 酵素反応で有用な生分解性の高分子化合物を製造する際に、触媒量の補酵素（C o A）で効率的に製造できる方法を提供する。

【解決手段】 チオエステル交換反応と高分子重合酵素反応を共存させてアシルコエンザイム（アシルC o A）を反応系内で再生せてチオエステルから高分子化合物を一貫して合成することの出来る効率的な生分解性の高分子化合物、特にポリエステルがポリヒドロキシアлкаノエートの製造方法。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-094881
受付番号	50300531050
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年 4月 4日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000002004
【住所又は居所】	東京都港区芝大門1丁目13番9号
【氏名又は名称】	昭和電工株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】	100081086
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口 第2ビル7階 大家特許事務所
【氏名又は名称】	大家 邦久

【代理人】

【識別番号】	100117732
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口 第二ビル7階 大家特許事務所
【氏名又は名称】	小澤 信彦

【代理人】

【識別番号】	100121050
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口 第2ビル7階 大家特許事務所
【氏名又は名称】	林 篤史

次頁無

特願 2 0 0 3 - 0 9 4 8 8 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 2 0 0 4]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都港区芝大門 1 丁目 1 3 番 9 号

氏 名

昭和電工株式会社